

学位論文要旨

基底膜由来 matricryptins の新規内因性心保護因子としての役割  
解明

Elucidation of the role of basement membrane-derived matricryptins  
as a novel endogenous cardioprotective factor

北里大学大学院獣医学系研究科

獣医学専攻 博士課程

安田 純平

Jumpei Yasuda

指導教授 山脇 英之

平成 29 年度

2017

虚血性心疾患における低酸素・低栄養ストレスや高血圧症における持続的な圧過負荷は、組織の構造支持体である細胞外マトリックス(extracellular matrix, ECM)の産生と分解を伴う心リモデリングを引き起こす。ECMの分解を介して産生される matricryptins は抗血管新生作用をはじめとする様々な生理活性を持つ。近年、心疾患患者の血中や心疾患モデル動物の心臓組織において基底膜 ECM 由来の matricryptins である XVIII 型コラーゲン分解断片”endostatin”や IV 型コラーゲン $\alpha$ 3 分解断片”tumstatin”の発現が変化することが明らかとなった。本研究はこれら基底膜由来 matricryptins の心臓における未知の役割を解明することを目的とした。

#### 1. モルモット単離心室筋細胞の T 型 $Ca^{2+}$ チャネル活性に及ぼす endostatin の影響

Endostatin は強力な血管新生阻害作用を持つことから抗腫瘍薬として開発が進められてきた。T 型  $Ca^{2+}$ チャネルは心疾患病態時の心室筋細胞において発現し、不整脈や心肥大の発症・進展に関与すると考えられている。Endostatin はヒト神経膠芽腫 U87 細胞の T 型  $Ca^{2+}$ チャネル活性を阻害することが報告された。第一章では正常心室筋細胞においても T 型  $Ca^{2+}$ チャネルを発現するモルモット単離心室筋細胞を用いてホールセル・パッチクランプ法により膜電流を測定し、endostatin が心筋細胞の T 型  $Ca^{2+}$ チャネル活性を抑制することを初めて明らかにした(Yasuda et al. *J. Vet. Med. Sci.* 2015)。本研究結果から、endostatin が T 型  $Ca^{2+}$ チャネル活性阻害を介した心保護作用を持つ可能性が示唆された。

#### 2. ラット心線維芽細胞機能に及ぼす tumstatin 活性断片 T3 peptide の影響

心筋梗塞による心筋障害において、心線維芽細胞は障害部位へ遊走、増殖することで創傷治癒に重要な役割を果たしている。またブタ虚血/再灌流障害モデルの心臓組織において tumstatin 発現が変化することが報告されており、tumstatin と心筋梗塞を含めた虚血性心疾患との関連が示唆されている。第二章では初代培養ラット心線維芽細胞機能に及ぼす tumstatin 活性断片 T3 peptide (69-88 アミノ酸残基)の影響を検討した。T3 peptide は心線維芽細胞の増殖と遊走能を有意に亢進した。T3 peptide は Akt とその下流シグナル因子 p70S6K のリン酸化を有意に亢進し、phosphatidylinositol 3-kinases/Akt 阻害薬 LY294002 は T3 peptide 誘導性増殖、遊走および Akt と p70S6K のリン酸化亢進を有意に抑制した。また tumstatin 受容体として知られる  $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$  インテグリン阻害薬 cilengitide は T3 peptide 誘導性増殖および Akt リン酸化亢進を抑制した。本章では T3 peptide がインテグリン/Akt/p70S6K シグナル経路の活性化を介してラット心線維芽細胞の増殖と遊走能を亢進することを初めて明らかにした。Tumstatin が心筋梗塞後の治癒を促進する可能性が示唆された (Yasuda et al. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2017)。

### 3. H9c2 心筋芽細胞における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 誘導性アポトーシスに及ぼす T3 peptide の影響

心筋梗塞における虚血/再灌流障害は活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) 産生増加を介して心筋細胞死を誘導する。第三章では ROS の一種 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による H9c2 心筋芽細胞死に及ぼす T3 peptide の影響を検討した。T3 peptide は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 誘導性の生細胞数低下、核のアポトーシス様変化およびアポトーシス関連タンパク質 caspase-3 の活性化を有意に抑制した。さらに T3 peptide は

caspase-3 活性化に関わる  $H_2O_2$  誘導性ミトコンドリアの断片化と膜電位の低下および細胞内 ROS 産生を有意に抑制した。Cilengitide は T3 peptide による ROS 産生抑制作用を解除した。本章では、H9c2 心筋芽細胞において T3 peptide がインテグリンへの結合を介して  $H_2O_2$  誘導性細胞内 ROS 産生を抑制することにより、ミトコンドリア傷害/caspase-3 活性化/アポトーシスを阻害し細胞保護作用を示すことを初めて明らかにした (Yasuda et al. *Eur. J. Pharmacol.* 2017)。

#### 4. 心筋虚血/再灌流障害に対する T3 peptide の保護作用

第四章では、in vitro および ex vivo 虚血/再灌流障害モデルを用いて第三章で明らかにした tumstatin の心保護作用を検討した。In vitro において、T3 peptide は低栄養・低酸素下で培養(虚血)後、正常栄養・正常酸素下で培養(再灌流障害)することで誘導した H9c2 心筋芽細胞死と細胞内 ROS 産生を有意に抑制した。Ex vivo においては、ランゲンドルフ灌流装置を用いてラット摘出心臓組織を栄養液の灌流停止(虚血)後に再灌流することで虚血/再灌流障害モデルを作製した。T3 peptide は虚血/再灌流誘導性の左室機能低下を抑制する傾向を示すと共に、心電図 QRS 間隔延長および塩化トリフェニルテトラゾリウムに未染色の梗塞領域形成を有意に抑制した。よって T3 peptide は虚血/再灌流誘導性心筋梗塞領域形成を阻害することで左室機能低下と心電図異常を抑制したと考えられる。本章では、T3 peptide が H9c2 心筋芽細胞(in vitro) およびラット摘出心臓標本(ex vivo)において虚血/再灌流誘導性心筋細胞死を抑制し、心保護作用を示すことを初めて明らかにした。本章の成果はこれまでの結果と併せて、tumstatin または T3 peptide が新規の虚血性心疾患治療戦略を生み出す標的となり得

ることを示唆するものである。

本研究の第一章では、**endostatin** が心肥大や不整脈の発症・進展に関わると考えられる心筋細胞の T 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル活性を抑制することを初めて明らかにした。また第二章では **tumstatin** 活性断片 **T3 peptide** がラット心線維芽細胞の活性化を介して心筋梗塞後の創傷治癒に関与する可能性を初めて示した。さらに第三章と第四章では **T3 peptide** が抗酸化作用を介して虚血/再灌流障害に対して保護的に働く可能性が初めて示唆された。以上の結果から、**endostatin** および **tumstatin** が心疾患病態形成において抗血管新生作用以外の生理活性を示し、心保護的に働くことが初めて示唆された。今後これらの **matricryptin** が心疾患に対する新規治療薬開発の標的分子となることが大いに期待される。